

PCT/EP 00 / 01471

MODULARIO
I.C.A. - 101

Mod. C.E. - 1-4-7

09/918391

09/918391

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

REC'D 02 MAY 2000

WIPO PCT



E P00 / 1471

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per INV. IND.

N. MI99 A 000417

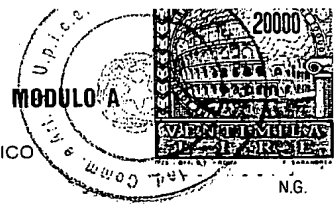
*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li 10 FEB. 2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE
Ing. DI CARLO

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione INDENA S.p.A. SP
Residenza Milano codice 04411780150
2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altri cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.
via Rossini n. 8 città Milano cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) C07D gruppo/sottogruppo 263 / 106

"Procedimento per la preparazione di tassani da 10-desacetilbaccatina III"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) Bombardelli Ezio 3) _____
2) _____ 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
1) _____	_____	_____	____/____/____	_____
2) _____	_____	_____	____/____/____	_____

SCIoglimento RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.	PROV	RIS	DESCRIZIONE
Doc. 1) <u>2</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2) <u>0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3) <u>0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	lettera d'incarico, pro XXXXXXXXXXXXXXX
Doc. 4) <u>0</u>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	designazione inventore
Doc. 5) <u>0</u>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) <u>0</u>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) <u>0</u>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	nominativo completo del richiedente

SCIoglimento RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

8) attestati di versamento, totale lire trecentosessantacinquemila# obbligatorio

COMPILATO IL 02/03/1999

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Minoja Fabrizio

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI MILANO codice 15

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA MI99A 000417 Reg. A.

L'anno millenovecento NOVANTANOVE, il giorno DUE, del mese di MARZO

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IN DEPOSITANTE
Bighin Michele

timbro
dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE
CORTONESI MAURIZIO

NUMERO DOMANDA

1199A00047

REG. A

DATA DI DEPOSITO

0203/1999

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

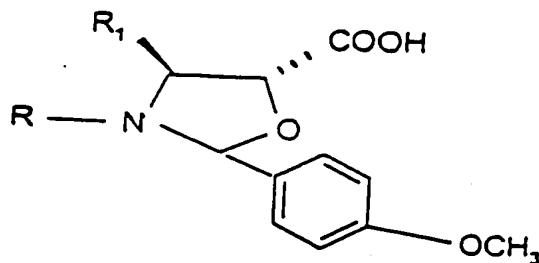
2/ /

D. TITOLO

"PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE DI TASSANI DA 10-
DESACETILBACCATINA III"

L. RIASSUNTO

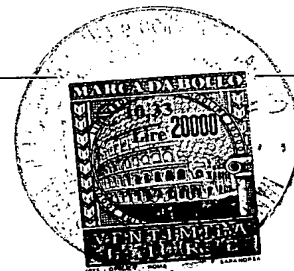
Si descrive un procedimento per la preparazione di derivati tassanici per reazione di 10-desacetilbaccatina III protetta in 7 e in 10 con gruppi tricloroacetili con un composto di formula VII



(VII)

e successiva rimozione dei gruppi protettivi e idrolisi dell'anello ossazolidinico.

M. DISEGNO



5767 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

FMMABas "PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE DI TASSANI DA 10-
DESACETILBACCATINA III"

a nome : INDENA S.p.A.

MI 99 A 000 4 171

con sede in: Milano

* *

2 MAR. 1999

La presente invenzione riguarda un procedimento per la preparazione di tassani da 10-desacetilbaccatina III.

Il Paclitaxel è un noto farmaco antitumorale a struttura tassanica la cui preparazione industriale ha posto problemi di non facile soluzione.

Inizialmente isolato e prodotto per estrazione dalle cortecce del tronco di *Taxus brevifolia*, il Paclitaxel viene oggi sintetizzato a partire dalla 10-desacetilbaccatina III, un intermedio presente nelle foglie di diverse specie di tasso, in modo particolare in quelle di *Taxus baccata* L., eliminando così problemi di tipo ambientale connessi alla disponibilità della corteccia di *T. brevifolia*.

Numerosi sono i metodi di sintesi riportati in letteratura: nel brevetto US Re. 34,277 (reissue del brevetto US 4,924,011), viene riportata la semisintesi del Paclitaxel partendo dalla 10-desacetilbaccatina III protetta all'idrossile in C-7 con un gruppo trialkilsilile, in particolare trietilsilile, ed in posizione 10 con un gruppo acetile. In WO 98/08832, la protezione dell'idrossile in C-7 viene effettuata utilizzando un gruppo tricloroacetile. Il derivato della baccatina III così protetto viene fatto reagire con bromuro di acetile e successivamente con l'opportuno derivato fenilisoserinico per ottenere, a seguito della deprotezione dei gruppi idrossilici in 7 e 2', e benzoilazione dell'ammina, il Paclitaxel.

In WO 93/06094, il Paclitaxel viene preparato facendo reagire un composto

beta-lattamico con 7-trietilsilil-baccatina III. A seguito della deprotezione in ambiente acido si ottiene il prodotto desiderato.

In US 5 476 954, la sintesi del Paclitaxel viene effettuata a partire dalla 10-desacetilbaccatina III proteggendo l'idrossile in C-7 con 2,2,2,tricloroetossicarbonile (Troc) e l'idrossile in C-10 con lo stesso Troc o con un gruppo acetile.

E' pertanto evidente che il passaggio critico per la sintesi del Paclitaxel è la esterificazione selettiva in C-7 con un gruppo facilmente e selettivamente rimovibile. Fino ad oggi l'intermedio chiave è stato considerato la 7-trietilsilil-desacetilbaccatina III. La resa di reazione descritta per la derivatizzazione della 10-desacetilbaccatina III a 7-trietilsilil-10-desacetilbaccatina III è circa dell'85% con un impiego da 5 a 20 moli di reagente sililante. Anche la resa della successiva acetilazione a dare la 7-trietilsilibaccatina III è circa dell'85%.

I brevetti US 5 621 121 e US 5 637 723 descrivono la sintesi di tassani, Paclitaxel incluso, per reazione di baccatina III o 10-deacetilbaccatina III opportunamente protette con acido ossazolidin-5-carbossilico recante in posizione 2 un gruppo fenile sostituito da gruppi alcossi (US 5 621 121) o da gruppi trialogenoalchile, in particolare triclorometile (US 5 637 723), seguita da rimozione dei gruppi protettori con apertura dell'anello ossazolidinico.

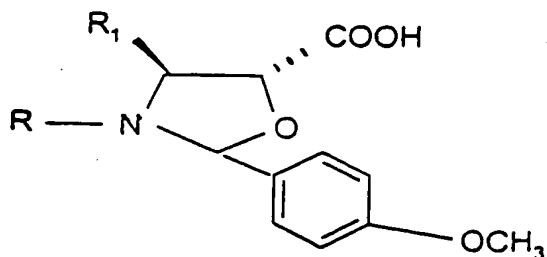
I gruppi protettori indicati come particolarmente adatti comprendono gruppi sililici 2,2,2,-tricloroetossicarbonile o 2-(2(triclorometil)propossi)carbonile.

Sostanzialmente gli stessi metodi sono utilizzabili anche per la preparazione del docetaxel, un altro noto derivato tassanico di largo impiego clinico.

Si è ora trovato un metodo di sintesi di tassani, in particolare del Paclitaxel e del docetaxel, che consente di raggiungere rese più elevate rispetto ai metodi noti.

Il metodo dell'invenzione, riportato nello schema, prevede:

- a) la protezione simultanea con acido tricloroacetico dei gruppi idrossile in posizione 7 e 10 della 10-deacetilbaccatina III;
- b) la successiva esterificazione dell'idrossile in 13 per reazione con un composto di formula (VII):

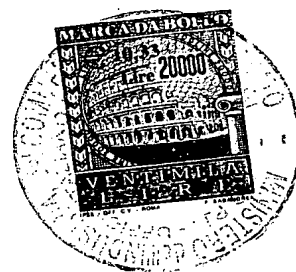
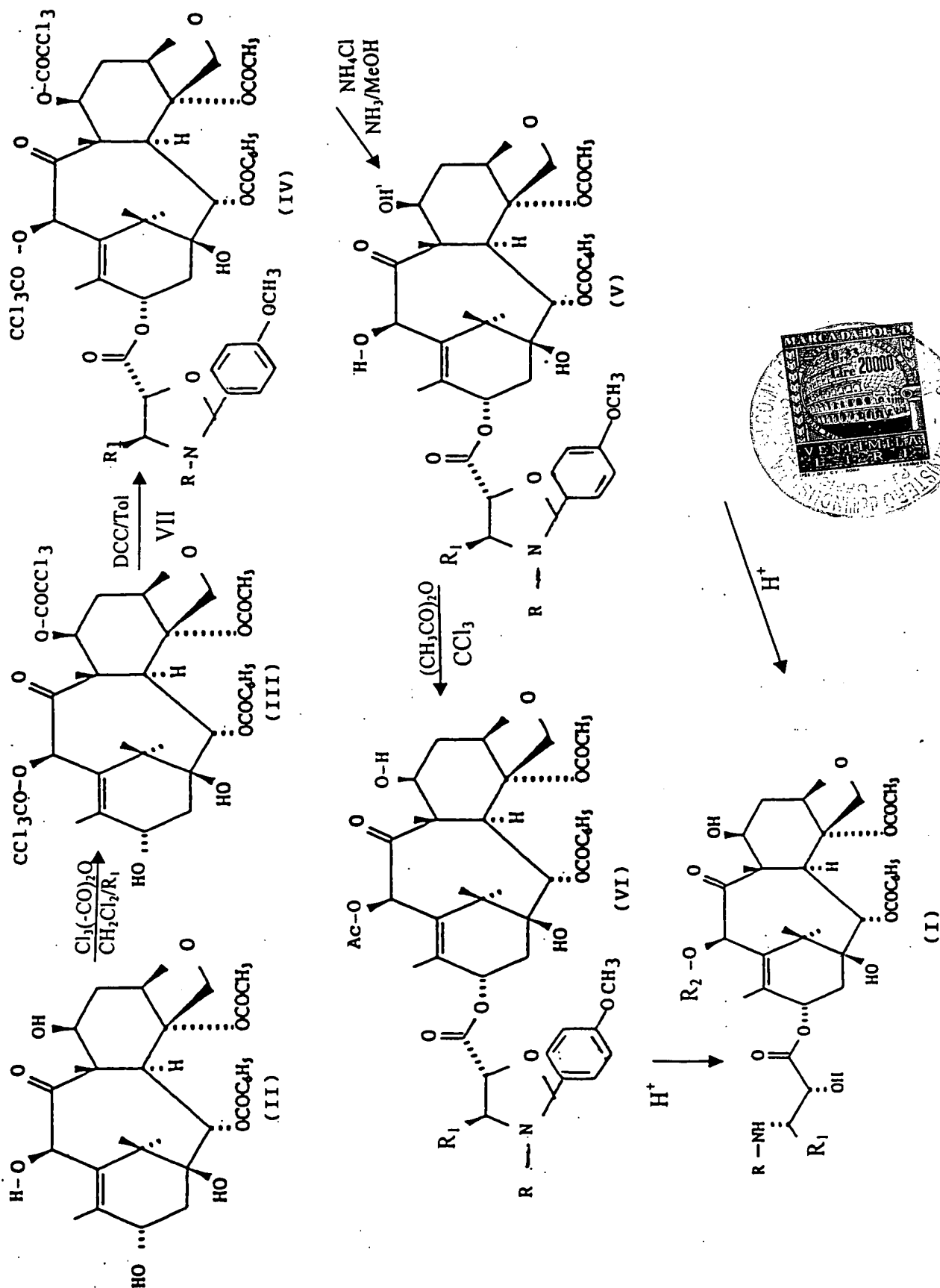


(VII)

dove R può essere tert.butossicarbonile, benzoile o il residuo di un acido alifatico lineare o ramificato e R_1 può essere fenile o una catena alchilica o alchenilica lineare o ramificata;

- c) la rimozione dei gruppi protettori tricloroacetici;
- d) l'opzionale acetilazione selettiva dell'idrossile in posizione 10, per i prodotti in cui R_2 è acetile;
- e) l'idrolisi acida dell'anello ossazolidinico.

Schema



Il metodo dell'invenzione si discosta da quelli noti per la sequenza di reazioni impiegate che consentono una semplificazione dei procedimenti noti sopra citati e un sostanziale miglioramento delle rese ottenibili.

Lo stadio a) viene effettuato in modo di per sé convenzionale con anidride tricloroacetica in opportuni solventi e in presenza di basi quali piridina, trietilammina e simili.

L'esterificazione con il derivato dell'acido ossazolidin-5-carbossilico viene condotta in presenza di un agente condensante quale dicicloesilcarbodiimide o altri agenti noti, in un solvente organico anidro, preferibilmente idrocarburi alifatici, aromatici o clorurati, a temperature comprese tra la temperatura ambiente e la temperatura di ebollizione del solvente.

L'estere ossazolidinico ottenuto viene quindi deprotetto rimuovendo i gruppi 7- e 10-tricloroacetossi per trattamento con $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ in alcoli alifatici, preferibilmente in metanolo.

L'acetilazione selettiva dell'idrossile in posizione 10 viene effettuata con anidride acetica in presenza di sali di cerio III, scandio o itterbio, in un solvente quale tetraidrofurano, diclorometano, etile acetato, a temperature comprese tra 5 e 40°C.

Il trattamento con acidi organici o inorganici in solventi quali metanolo, etanolo, tetraidrofurano, a temperature comprese tra -2 e +2°C circa porta alla formazione del derivato tassanico desiderato. L'uso dell'acido formico in tetraidrofurano a una temperatura di 0°C è particolarmente preferito.

Gli intermedi ossazolidinici sono noti oppure possono essere preparati con metodi noti, per reazione di un estere isoserinico con 4-metossi-benzaldeide.

Nella formazione dell'ossazolidina risulta particolarmente importante la scelta

dell'aldeide anisica in quanto l'acido ossazolidinico, contrariamente ai metodi descritti in US 5 621 121, 5 637 723 (Rhône-Poulenc Rorer), e 5 821 363 (UpJohn), può agevolmente essere cristallizzato e portato ad un rapporto isomerico 95:5 che è estremamente utile e vantaggioso per il passaggio successivo. L'acido ossazolidincarbossilico ottenibile con l'aldeide anisica è inoltre particolarmente stabile nelle fasi di deprotezione dell'estere tricloroacetico e nella successiva fase di acetilazione. In queste condizioni, la 2,4-dimetossibenzaldeide impiegata in US 5 821 363 o il cloralio o la p-triclorometil-benzaldeide descritti in US 5 621 121 e 5 637 723 (Rhône-Poulenc Rorer) non sono sufficientemente stabili.

Il procedimento dell'invenzione, oltre alla preparazione di Paclitaxel ($R =$ benzoile, $R_1 =$ fenile) e di docetaxel ($R =$ tert.butossicarbonile, $R_1 =$ fenile), consente anche la preparazione efficiente e conveniente di altri derivati tassanici.

I composti di formula IV non sono stati descritti in precedenza e costituiscono un ulteriore oggetto dell'invenzione, come intermedi utili per la sintesi di derivati tassanici.

I seguenti Esempi illustrano l'invenzione in maggior dettaglio.

Esempio 1 – Preparazione di 7,10-di-tricloroacetil-10-desacetilbaccatina III.

A una soluzione di 10 g di 10-desacetilbaccatina III (18,4 mmol) in 125 ml di metilene cloruro anidro e 42 ml di piridina si aggiungono gocciolando 4,77 ml di anidride tricloroacetica (42,32 mmol). Si mantiene la miscela di reazione sotto agitazione per tre ore o in ogni caso fino a reazione completa controllata per TLC su gel di silice usando come eluente una miscela n-esano/etile acetato 5:5. A fine reazione si aggiungono 5 ml di metanolo per distruggere l'eccesso di anidride tricloroacetica e quindi acqua. Si lava accuratamente la fase organica con acqua acida per HCl per eliminare la piridina, mentre si disidrata la rimanente fase

organica su MgSO_4 e si concentra a secco sotto vuoto. Si ottiene un solido giallino (17 g) che dopo cristallizzazione da cloroformio mostra le seguenti caratteristiche chimiche e spettroscopiche:

IR (KBr) 3517, 1771, 1728, 1240, 981, 819, 787, 675 cm^{-1} ;

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz); δ 8,11 (Bz AA'), 7,58 (Bz C), 7,46 (Bz, BB'), 6,50 (s, H-10), 5,72 (m, H-H-2), 5,02 (d, $J = 8$ Hz, H-5), 4,95 (m, H-13), 4,37 (d, $J = 8$ Hz, H-20a), 4,18 (d, $J = 8$ Hz, H-20b), 4,02 (d, $J = 6$ Hz, H-3), 2,32 (s, 4-Ac), 2,22 (s, H-18), 1,91 (s, H-19), 1,25 e 1,11 (s, H-16, H-17), p.f. = 172-175°C, $[\alpha]_D - 36^\circ$ (MeOH; $C = 0,6$).

Esempio 2 – Preparazione di 13-(2-(4-metossibenziliden)-N-benzoil-4-fenil-ossazolidil)-10-desacetilbaccatina III.

Si sciolgono 17 g di 7,10-ditricloracetil-10-desacetilbaccatina III in 250 ml di toluene anidro e sotto agitazione si aggiungono 12,6 g di acido 2-(4-metossifenil)-N-benzoil-4-fenil-ossazolidin-5-carbossilico e 6 g di DCC. Dopo agitazione per una notte a 40°C si filtra la miscela di reazione e si concentra a secco. Si scioglie il residuo in 300 ml di metanolo/tetraidrofurano e si aggiungono 24 ml di una soluzione acquosa di NH_3 2M. Dopo 1,5 ore a temperatura ambiente si concentra sotto vuoto la miscela di reazione a piccolo volume, quindi si diluisce con acqua e si estrae il tutto con etile acetato. Si concentra a secco l'estratto e si purifica il residuo su colonna di gel di silice eluendo il prodotto con una miscela di etile acetato/etere di petrolio 1:1. Si ottengono 16,8 g di prodotto del titolo con p.f. 135°C e $[\alpha]_D - 58^\circ$ (MeOH, $C = 0,5$).

Esempio 3 – Preparazione di 13-(2-(4-metossibenziliden)-N-benzoil-4-fenil-ossazolidil)-baccatina III.

A una soluzione di 13,7 g di prodotto dell'esempio II in 200 ml di

tetraidrofurano si aggiungono 56 ml di una sospensione al 10% di $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in tetraidrofurano, seguiti da 5,5 ml di anidride acetica. Dopo agitazione per una notte a temperatura ambiente si filtra la miscela di reazione, si tratta il filtrato con metanolo e si concentra a piccolo volume; si diluisce il tutto con H_2O e si estrae il prodotto con etile acetato. Si ottengono 12 g (84%) di 13-(2-(4-metossibenziliden)-N-benzoil-4-fenil-ossazolidil-)-baccatina III avente le seguenti caratteristiche fisiche e spettroscopiche:

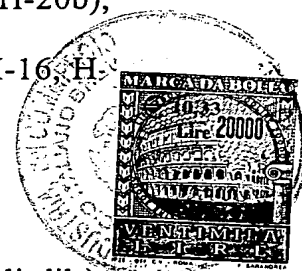
$^1\text{H-NMR}$: 8,07 (d, Bz), 7,60-7,19 (m, aromatici), 7,48 - 6,90 (AA', BB', p-OMePh), 6,33 (s, H-10), 5,67 (d, $J = 5$ Hz, H-2), 5,56 (br s, H-3'), 4,93 (d, $J = 8$ Hz, H-5), 4,90 (br s, H-2'), 4,45 (m, H-7), 4,28 (d, $J = 8$ Hz, H-20a), 4,16 (d, $J = 8$ Hz, H-20b), 3,82 (s, OMe), 2,27 (s, Ac), 2,08 (s, OAc), 1,66 (s, H-19), 1,29 - 1,16 (s, H-16, H-17), p.f. 146°C , $[\alpha]_D = -62^\circ$ (MeOH, $C = 0,8$).

Esempio 4 – Preparazione Paclitaxel

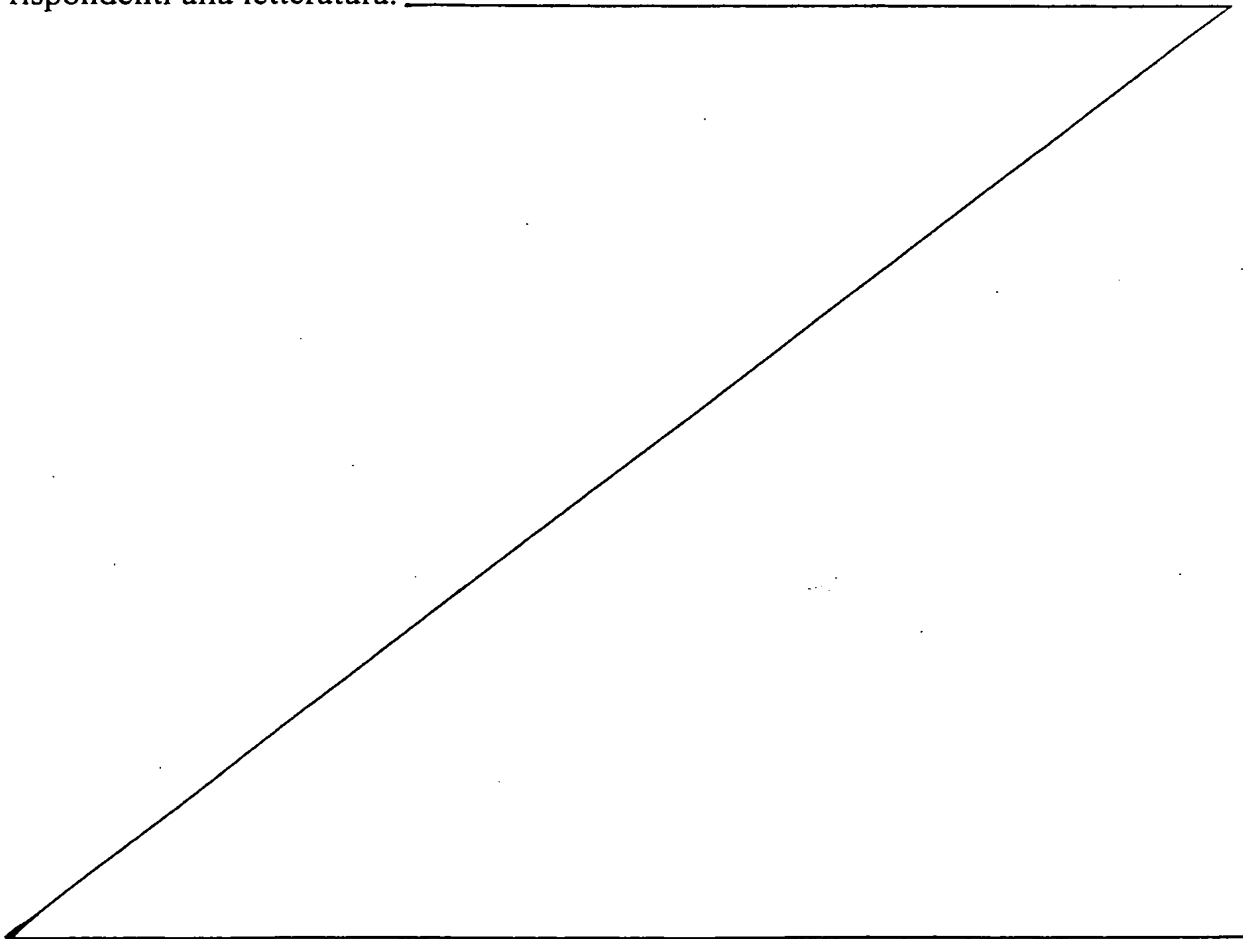
12 g di 13-(2-(4-metossibenziliden)-N-benzoil-4-fenil-ossazolidil-)-baccatina III sono sciolti in 50 ml di tetraidrofurano ed addizionati a 0°C di 5 ml di acido formico; si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a 0°C per tre ore, quindi si diluisce con acqua, si neutralizza l'acido formico con KHCO_3 e si estrae ripetutamente la sospensione con etile acetato. Si lavano con acqua gli estratti eteroacetici e si concentra a volume ridotto. Dopo cristallizzazione dallo stesso solvente si ottengono 10,5 g di Paclitaxel avente le caratteristiche chimico-fisiche e spettroscopiche rispondenti alla letteratura.

Esempio 5: Preparazione di Docetaxel.

Si sciolgono 17 g di 7,10-ditricloracetil-10-desacetilbaccatina III in 250 ml di toluene anidro e sotto agitazione si addizionano 11,6 g di acido 2-(4-metossifenil)-N-tert.butossicarbonil-4-fenil-ossazolidin-5-carbossilico e 6 g di DCC. Dopo

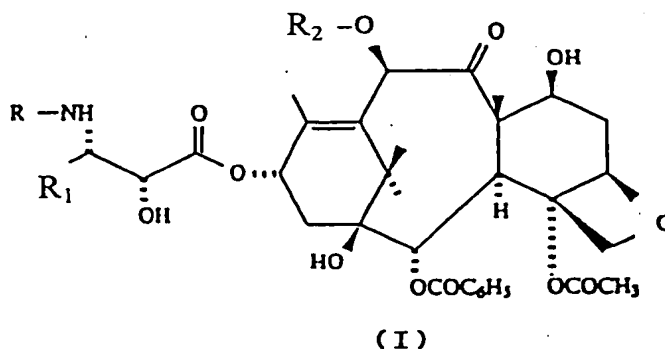


agitazione per una notte a 40°C si filtra la miscela di reazione e si concentra a secco. Si scioglie il residuo in 300 ml di metanolo/tetraidrofurano e si aggiungono 24 ml di una soluzione acquosa di NH_3 2M. Dopo 1,5 ore a temperatura ambiente si concentra sotto vuoto la miscela di reazione a piccolo volume, quindi si diluisce con acqua e si estrae il tutto con etile acetato. Si concentra a secco l'estratto e 10 g di questo residuo, sciolti in THF, sono aggiunti a 0°C a 5 ml di acido formico. Si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a 0°C per tre ore, quindi si diluisce con acqua, si neutralizza l'acido formico con KHCO_3 e si estrae ripetutamente la sospensione con etile acetato. Si lavano con acqua gli estratti organici e si concentra a volume ridotto. Dopo cristallizzazione dallo stesso solvente si ottengono 9,2 g di docetaxel avente le caratteristiche chimico-fisiche e spettroscopiche rispondenti alla letteratura.



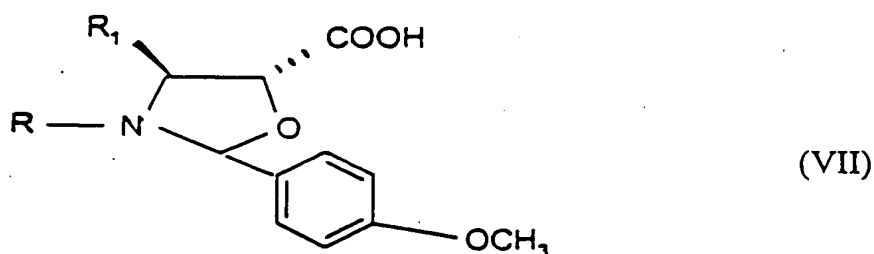
RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la preparazione dei composti di formula I



dove R può essere tert.butossicarbonile, benzoile o il residuo di un acido alifatico lineare o ramificato, R_1 può essere fenile o una catena alchilica o alchenilica lineare o ramificata e R_2 può essere idrogeno o acetile, che comprende:

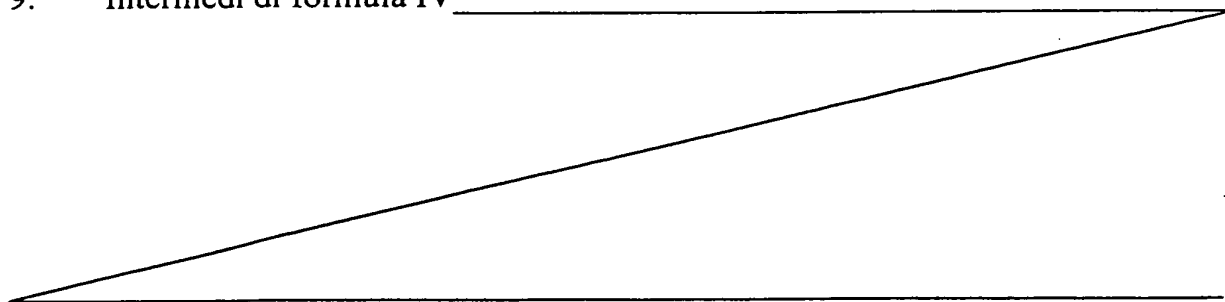
- a) la protezione simultanea con acido tricloroacetico dei gruppi idrossile in posizione 7 e 10 della 10-deacetilbaccatina III;
- b) la successiva esterificazione dell'idrossile in 13 per reazione con un composto di formula (VII):

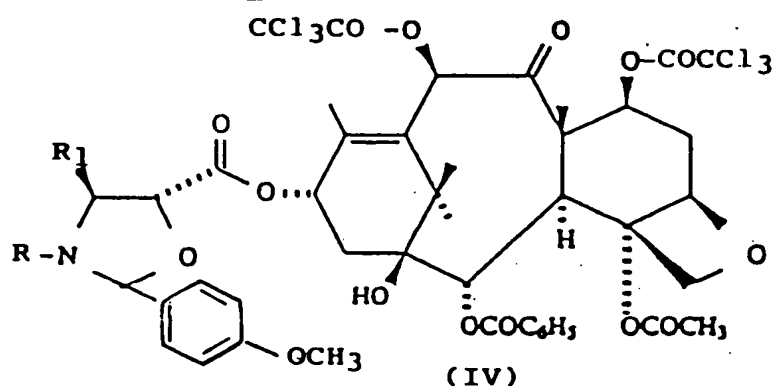


dove R può essere tert.butossicarbonile, benzoile o il residuo di un acido alifatico lineare o ramificato e R_1 può essere fenile o una catena alchilica o alchenilica lineare o ramificata;

- c) la rimozione dei gruppi protettori tricloroacetici;

- d) l'opzionale acetilazione selettiva del gruppo idrossile in posizione 10;
 - e) l'idrolisi acida dell'anello ossazolidinico.
2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui lo stadio b) viene effettuato in presenza di un agente condensante e di una base.
 3. Procedimento secondo la rivendicazione 2 in cui l'agente condensante è la dicicloesilcarbodiimide e la base è piridina.
 4. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui la rimozione dei gruppi 7 e 10 tricloroacetossi viene effettuata per trattamento con $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ in solventi alifatici.
 5. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti in cui l'acetilazione selettiva dello stadio d) viene effettuata per reazione con anidride acetica in presenza di sali di cerio III, scandio o itterbio.
 6. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui lo stadio e) è effettuato con acidi organici o inorganici in alcoli alifatici o tetraidrofurano.
 7. Procedimento secondo la rivendicazione 6, in cui l'idrolisi è effettuata con acido formico.
 8. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti per la preparazione di Paclitaxel ($\text{R} = \text{benzoile}$, $\text{R}_1 = \text{fenile}$, $\text{R}_2 = \text{acetile}$) o docetaxel ($\text{R} = \text{tert.butossicarbonile}$, $\text{R}_1 = \text{fenile}$, $\text{R}_2 = \text{H}$).
 9. Intermedi di formula IV _____





dove R e R₁ sono come definiti nella rivendicazione 1.

Milano, 2 marzo 1999

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
di Bianchetti · Bracco · Minoja s.r.l.

